PCT WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentkiassifikation ⁵:

C12Q 1/68, C12P 19/34

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/26928

A2 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

24. November 1994 (24.11.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE94/00568

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. Mai 1994 (17.05.94)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

(30) Prioritätsdaten:

P 43 17 414.0

18. Mai 1993 (18.05.93)

DE

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BAUER, David [DE/DE]; Uhlandstrasse 56, D-13156 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).
- (54) Title: COMPLEX DIAGNOSTIC AGENT OF GENETIC EXPRESSION AND MEDICAL DIAGNOSIS AND GENE ISOLATION PROCESS USING SAID DIAGNOSTIC AGENT
- (54) Bezeichnung: MITTEL ZUR KOMPLEXEN DIAGNOSTIK DER GENEXPRESSION UND VERFAHREN ZUR ANWENDUNG FUR DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK UND DIE GENISOLIERUNG

(57) Abstract

A complex diagnostic agent of genetic expression consists of a set of at least 288 oligonucleotide primer pairs composed of a reserve of at least 24 5'-oligonucleotide primers and at least 12 3'-oligonucleotide primers. The length of the oligonucleotide primers lies between 6 and 13 nucleotides, and preferably equals 10 nucleotides. The sequences of the 5'-oligonucleotide primers preferably have the same number of G+C and A+T. With this agent, at least 288 parallel and independent PCR tests are carried out in a cDNA mixture. After separation in non-denaturating polyacrylamide gels, the line pattern is recorded and compared with the standard of a reference cell. The fragment profiles are preferably automatically recorded by colour marked primers. The invention has applications in molecular biology, in particular for identifying known and unknown expressed genes and for isolating genes, as well as in clinical diagnosis, for example for detecting morbid changes, including cancer.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression. Es besteht aus einem Satz von mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleotid-Primern gebildet werden. Die Länge der Oligonukleotid-Primer liegt bei 6-13, bevorzugt 10, Nukleotiden, wobei die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen. Mit dem Mittel werden in einem cDNA-Gemisch mindestens 288 parallele und unabhängige PCR-Ansätze durchgeführt. Nach Trennung in nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen wird das Bandenmuster registriert und mit dem Standard einer Referenzzelle verglichen. Dabei wird bevorzugt mit farbmarkierten Primern eine automatische Aufzeichnung der Fragmentprofile vorgenommen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, insbesondere die Identifizierung bekannter und unbekannter exprimierter Gene und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik, z.B. zur Feststellung von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.

BNSDOCID: <WO___9426928A2_I_>

H

-

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
ΑÜ	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgies	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungara	NZ	Neusceland
BJ	Benin	Œ	<u>Irland</u>	PL	Poles
BR	Brasilien	П	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Sch weden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechteostein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
cs	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trimidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ulcraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MIL	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Victnam

J.

Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression und Verfahren zur Anwendung für die medizinische Diagnostik und die Genisolierung

Beschreibung

3

TO THE REAL PROPERTY.

. ...

Č

'n

300

/ •

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression und ein Verfahren zur Anwendung des Mittels. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, insbesondere die Untersuchung von exprimierten Genen und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.

Die Analyse des menschlichen Genoms hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die Ermittlung der Bausteinreihenfolge des gesamte Erbmaterials (Genoms) wird international angestrebt. Damit werden Aussagen über Genstruktur und konkrete genetische Defekte möglich, die zur Personenidentifikation angewendet werden können. Da das Gesamtgenom sehr komplex ist, wird alternativ die Ermittlung der Sequenzen nur der tatsächlich aktiven Gene angestrebt. Dies ist relativ leicht möglich durch das Anlegen einer cDNA-Bibliothek eines bestimmten Zelltyps und die anschließende Sequenzierung aller Einzelklone (PCT-Patent WO 93/353).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion oder PCR-Technik hat andererseits die Möglichkeit geschaffen, jedes beliebige DNA-Stück oder Gen zu identifizieren und zu vermehren. Diese Technik läßt sich auf die Identifizierung exprimierter Gene, d.h. den Nachweis der Synthese einer entsprechenden mRNA, anwenden (Rappolee, D.A. et al. Science 241/1988/708). Dabei wird zunächst mRNA mit Hilfe einer Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die Amplifikation mit bestimmten Primern eingesetzt wird. Diese Technik wird heute bereits für die Diagnostik der Expression bestimmter Gene im Routinelabor eingesetzt. Sie ist aber nur auf bereits bekannte Gene anwendbar, da die Primer aufgrund der bekannten Gensequenz festgelegt und synthetisiert wurden.

ģş

,

100

die molekulare Diagnostik von Veränderungen in der Genexpression, die beispielsweise mit Krankheitsprozessen einhergehen, wäre die Verfügbarkeit einer Technik wünschenswert. die alle, also auch noch unbekannte, Genfunktionen erfassen ließe. Das bedeutet, daß ein Weg gefunden werden muß, um alle mRNA-Spezies auch ohne Kenntnis ihrer Sequenz zu identifizieren. Eine derartige Technik wurde erstmals von Liang und Pardee (Science 257/1992/967) vorgestellt. Sie basiert auf der fraktionierten Herstellung von cDNA mit Primern, die entweder 12 oder 4 Fraktionen entstehen lassen. Diese cDNA-Fraktionen werden anschließend mit mehreren kurzen Primern in unabhängigen Reaktionen amplifiziert. Die Primer sind dabei so kurz (10 Nukleotide), daß ihre Chance relativ groß ist, in vielen CDNA-Spezies Homologien zu finden. Statistisch kann dabei davon ausgegangen werden, daß die Länge der entstehenden Fragmente unterschiedlich groß ist. Wenn einen genügend große Zahl von Primern geeigneter Sequenz eingesetzt wird, sollte es möglich sein, prinzipiell alle exprimierten mRNAs als cDNA-Fragment zu amplifizieren. Die Identifizierung der Fragmente wurde von Liang und Pardee nach radioaktiver Markierung durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Sequenzierungsgel durchgeführt. Diese Autoren haben ihre Methode zunächst zur Identifizierung von veränderter Genexpression in Brustkrebszellen eingesetzt (Science 257/1992/967, Cancer Research 52/1992/6966) dabei einige veränderte Banden identifiziert und anschließend die dazugehörigen Gene teilweise isoliert.

Bei der Verwendung der beschriebenen Methodik wird offensichtlich, daß die Identifizierung vieler Fragmente bzw. Banden auf einem Sequenzierungsgel möglich ist und beim Vergleich identischer PCR-Reaktionen von zwei Zelltypen auch viele Unterschiede gefunden werden können. Allerdings konnte festgestellt werden (Bauer et al., Nucleic Acids Research 21, 1993, S. 4272-4280), daß 1/3 bis 2/3 aller Fragmente tatsächlich nicht nur eine Bande, sondern 2-4 Banden produzieren, was mit der Eigenschaft der Taq-Polymerase zusammenhängt, am 3'-Ende der kopierten Stränge noch ein zusätzliches A anzuhängen. Darüberhinaus werden häufig die zwei Stränge eines Fragments aufgrund unterschiedlichen Purin-/Pyrimidin-Gehaltes separiert.

1

STATE OF THE PARTY.

ń

100

-17

So treten veränderte Banden vielfach als Block von unmittelbar aufeinanderfolgenden Banden auf. Dadurch wird eine Komplexität des Musters vorgetäuscht, die nicht vorhanden ist.

Die von Pardee und Liang angegebenen Primer reichen darüberhinaus keinesfalls aus, um die notwendige Komplexität des Fragmentmusters zu erreichen. Bei einer angenommenen Zahl von ca. 15 000 Genen, die in einer Zelle exprimiert werden, müßten mindestens 30 000 verschiedene Fragmente produziert und sichtbar gemacht werden, um mit großer Wahrscheinlichkeit auch nahezu jede mRNA erfaßt zu haben, wobei eine größere Zahl von Genen zweimal und eine kleinere Zahl dreimal oder häufiger repräsentiert sein müßten. Darüberhinaus wäre es wichtig,, das Diagnose-Verfahren universell anwendbar zu machen. Dafür ist eine Vereinfachung und gleichzeitige Objektivierung der Bandenerfassung notwendig.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Untersuchung der Genexpression zu verbessern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, die in Zahl und Sequenz geeigneten Oligonukleotid-Primer auszuwählen,

- (2.) ein Elektrophorese-System zu schaffen, das nur eine Bande pro Fragment produziert und
- (3.) alles mit einer Nachweismethode zu kombinieren, die eine Automatisierung der Methode zur Diagnostik von Veränderungen der Genexpression in kürzester Zeit ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Mittel ist durch einen Satz von mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren definierter Länge, gebildet durch Auswahl aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und 12 3'-Oligonukleotid-Primern, gekennzeichnet. Diese Oligonukleotid-Primer sind mit einem geeigneten Marker gekoppelt, der durch ein Nachweisverfahren erkannt werden kann.

Die Primer wurden aus einer Liste von 2000 zufälligen, Computergenerierten Sequenzen ausgewählt, 50 ausgewählte Sequenzen wurden experimentell geprüft, 26 davon erwiesen sich als

ERSATZBLATT

geeignet für das erfindungsgemäße Mittel.

Die Länge der Oligonukleotid-Primer beträgt 6-13 Nukleotide, bevorzugt 10 Nukleotide, wobei die Sequenzen der 5'-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl G+C und T+A aufweisen. Die 3'-Primer besitzen eine Reihe von T-Nukleotiden, bevorzugt 8-12, und zusätzlich am Ende in ein bis drei Positionen, bevorzugt in 2 Positionen, G-, C-, T- oder A-Nukleotide. Durch Kombination jedes der mindestens 24 5'-Primer mit jedem der (im Falle von 2 spezifischen endständigen Nukleotiden)12 3'-Primern entstehen die mindestens 288 Kombinationen gemäß der Erfindung.

Alle Primer sind markiert, wobei als Markierung radioaktiver Phosphor, ein Fluoreszenzfarbstoff, Biotin oder ein Antigen verwendet wird.

Bevorzugt eingesetzt werden die 5'-Oligonukleotid-Primer gemäß Anspruch 7. Diese Primer können erfindungsgemäß auch miteinander kombiniert werden, wobei eines der beiden eingesetzten Primer als 3'-Primer fungiert. Bei dieser Möglichkeit erhält man im Erfolgsfalle Teilsequenzen der jeweiligen cDNA, womit eine weitere Identifizierung erreicht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Anwendung des Mittels wird folgendermaßen durchgeführt

- 1. Die gesamte mRNA einer zu untersuchenden Zelle wird isoliert
- Umschreibung in cDNA entweder insgesamt oder in mehreren, bevorzugt 12, Fraktionen
- 3. Nachfolgende Amplifizierung durch mindestens 288 parallele und unabhängige Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) mit dem ausgewählten Mittel. Eine bevorzugte Temperatur für die Durchführung der Reaktion ist 40°C.
- 4. Auftrennung des entstandenen Fragmentgemischs jeder Reaktion auf einer gesonderten Bahn eines Polyacrylamid-Gels, bevorzugt auf 7 Gelen mit 48 Bahnen. Für den erfindungsgemäßen Erfolg ist wesentlich, daß ein nichtdenaturiertes Gel eingesetzt wird.
- 5. Ablesung der Bandensignale durch Autoradiographie oder durch nichtradioaktive Nachweise (Fluoreszenzfarbstoffe, Biotin oder ein Antigen) und Vergleich mit dem Muster einer Referenzzelle.

Die PCR-Reaktionen der Referenzzelle werden mit Primern

ERSATZBLATT

Š

~]

3

4

وقبن

durchgeführt, die mit einem anderen Farbstoff markiert sind, als die Primer für die PCR-Reaktionen der zu untersuchenden Zelle. Die mit Primern gleicher Sequenz, aber mit verschiedenen Farbstoffen markierten Fragmente von Referenz- und zu untersuchender Zelle werden gemäß der Erfindung gemeinsam in einer Bahn eines Sequenzautomaten aufgetrennt, wobei die Unterschiede der Genexpression durch ein unterschiedliches Farbsignal in einer bestimmten Position aufgezeigt werden.

Das neue Mittel kann gleichermaßen zur Isolierung von Genen oder Gensequenzen eingesetzt werden. Dabei wird eine Bande, aufgrund der gefundenen Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen als Repräsentant eines differentiell regulierten Gens identifiziert wurde, isoliert und als Sonde zur Gewinnung des entsprechenden Gens einer cDNA-Bank eingesetzt. Dazu wird die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in einer PCR-Inkubation mit einem biotinylierten Nukleotid amplifiziert und gleichzeitig markiert und anschließend mit einer denaturierten cDNA-Bibliothek in Lösung hybridisiert. Das resultierende Hybrid wird an magnetische Kugeln, die mit Streptavidin bedeckt sind, gebunden und von unspezifisch gebundenem Material freigewaschen. Die spezifisch gebundene cDNA wird freigesetzt und Transformation von E.coli eingesetzt. Aus diesen wird die Plasmid-DNA isoliert und das cDNA-Insert sequenziert. Durch Vergleich der ermittelten Sequenz mit der Sequenz-Datenbank wird festgestellt, ob es sich um ein bekanntes oder ein noch unbekanntes Gen handelt.

Das neue Mittel und das Verfahren zu seiner Anwendung erlauben die umfassende Darstellung exprimierter Gene in Form von jeweils mindestens einer Bande.

Innerhalb einer Woche kann die Analyse für einen bestimmten Zelltyp abgeschlossen werden, wonach der automatische Vergleich mit dem Muster der exprimierten mRNAs beliebiger anderer Zelltypen durchgeführt werden kann. Für die klinische Diagnostik von krankhaften genetischen Veränderungen z.B. bei Krebserkrankungen, wird durch die Erfindung ein erheblicher

河

The state of the s

. 7

₹

2

Fortschritt erreicht.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden:

ERSATZBLATT

3

The state of the s

έş

2

Ausführungsbeispiele

- Zytoplasmatische RNA der zu untersuchenden Zellen (normale Mausleber und regenerierende Mausleber) wurde in an sich bekannter Weise präpariert. Die RNA wurde anschließend auf 12 Inkubationsansätze verteilt und unter Verwendung der von Liang und Pardee (Science 257) beschriebenen Primer dT11XY einer reversen Transkriptionsreaktion in bekannter Weise unterzogen (dabei stellen X und Y alle Kombinationen der 4 Nukleotide G,A,T,C dar, mit der Ausnahme, daß in der Position X kein T verwendet wird). In jede Reaktion wurden folgende Komponenten pipettiert: 0.1-0.2 μ g RNA, 2.5 μ M dT₁₁XY Primer, 20 μM dNTP und 300 Einheiten MMLV Reverse Transcriptase. Die Reaktionen wurden bei 35°C für eine Dauer von 60 min inkubiert und durch 5 min Inkubation bei 95° C gestoppt. Die 12 erhaltenen cDNA-Fraktionen wurden dann spezifischen Polymerasekettenreaktionen (PCR) unterzogen:
 - a) Zunächst wurden aus einer Zahl von 2000 zufälligen, Computer-generierten Sequenzen einer Länge von 8-13 Nukleotiden 50 Kandidaten-Sequenzen ausgewählt, synthetisiert und als Primer für PCR Inkubationen mit jeweils 3 cDNA-Fraktionen eingesetzt. Dazu wurden folgende Reaktionen angesetzt: 2.5 μM dT₁₁XY Primer, 0.5 μM des entsprechenden 5'-Primers, 2 μ M dNTPs, 2 μ Ci (60 nM) ³³P-dATP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.2 mM MgCl2, and 1 U Tag Polymerase in einem Volumen von 20 μ l. Die Amplifikation wurde in 40 Zyklen mit 30 Sekunden bei 94° C, 1 Minute bei 42°C und 30 Sekunden bei 72° C durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden getrocknet und anschließend in 5 µl Formamid/Farbstofflösung aufgenommen. 1,5 µl wurden auf 6% Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenzgelen aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und der Autoradiographie unterzogen. Die Autoradiogramme wurden mit einem Scanner eingelesen, und die Zahl der Banden wurde ermittelt. Dabei wurde eine Zahl von 26 Primern mit sämtlichst 10 Nukleotiden Länge ermittelt , die mit den drei getesteten cDNA-Fraktionen eine Bandenzahl zwischen 40 und 160 ergaben. Diese Primer wurden als geeignet befunden, ein repräsentatives Bandenmuster aller exprimierten RNA-

Ħ

. 12

.

. 1

Spezies zu generieren.

- b) Es wurde ein Versuchsprotokoll konzipiert, das eine umfassende Darstellung aller exprimierten RNAs in kürzester Zeit und mit geringstem Aufwand erlaubte:
- Es wurden 12 PCR-Inkubationsmixturen vorbereitet, die bis auf den 5'-Primer alle unter a) genannten Komponenten enthielten, und zwar in einem Volumen von 15 μ l pro Einzelreaktion und ausreichend für 24 Reaktionen. Dabei enthielt jedes der 12 Röhrchen einen anderen 3'-Primer des Typs dT₁₁XY. Mit einer 12-Kanal-Pipette wurden jeweils 15 μ l der 12 Mixturen gleichzeitig in die erste Reihe einer Mikrotiterplatte (bzw. Röhrchen in diesem Format angeordnet) pipettiert. Dieser Schritt wurde 24 Mal für 3 Mikrotiterplatten wiederholt.
- Stammlösungen von 24 verschiedenen 5'-Primern wurden so angeordnet (3x8 Reihen), daß je 5 μ l von 8 verschiedenen Primern (Nr. 1-8 aus Tabelle 1) mit einer 8-Kanal-Pipette gleichzeitig in die erste senkrechte Reihe der ersten Mikrotiterplatte pipettiert werden konnten. Dieser Schritt wurde 12 Mal für die 12 senkrechten Reihen der ersten Platte wiederholt. Danach wurden die Primer Nr. 9-16 in die 12 senkrechten Reihen der zweiten Mikrotiterplatte und anschließend die Primer Nr. 17-24 in die 12 senkrechten Reihen der dritten Mikrotiterplatte transferiert. Die 288 Reaktionsansätze wurden durch kurzes Zentrifugieren der Platten gemischt. Dann wurden die drei Platten nacheinander in einem PCR-Gerät mit Mikrotiterformat-Heizblock für 40 Zyklen wie unter a) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgemische in einer Vakuumzentrifuge mit Mikrotiterplatten-Rotor bis zur Trocknung zentrifugiert. Danach wurden alle Reaktionsgemische in Formamid aufgenommen und der Elektrophorese wie unter a) unterzogen. Dazu wurden 6 Gele mit je 48 Bahnen beschickt. Nach der Trennung wurden die Gele getrocknet und mit einem Scanner eingelesen. Für die cDNAs der normalen Mausleber wurden in den 288 Bahnen insgesamt 20160 Banden identifiziert.

- 9 -

- c) Der Versuch von b) wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen mit verschiedenen "annealing"-Temperaturen zwischen 34°C und 45°C durchgeführt. Dabei erwies sich 40°C als das Optimum. Es wurden dabei fast doppelt so viel Banden gefunden wie bei 42°C, wobei die Muster ihre Individualität behielten.
- d) Zwecks Anwendung der Methode zur Identifizierung von Unterschieden in der Genexpression zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen eines Zellsystems wurden die RNAs von normaler Mausleber und regenerierender Mausleber verglichen. Dabei wurde die Prozedur b) mit 40° statt 42° C in gleicher Weise für beide RNAs durchgeführt, d.h. mit zwei Sätzen von je 3 Mikrotiterplatten. Die Elektrophorese wurde in insgesamt 12 Gelen durchgeführt, wobei generell die Proben mit den gleichen Primern aus beiden Ansätzen nebeneinander liefen. Im Ergebnis dieser Analyse wurden mindestens 70 Banden identifiziert, die nur in jeweils einer der beiden Ausgangs-RNAs vorhanden waren. Zahlreiche weitere Unterschiede konnten nur vermutet werden.
- e) Die Charakterisierung der unterschiedlichen Banden wurde durch Sequenzierung versucht. Dabei traten Probleme auf, die vor allem durch das Vorliegen von Einzelsträngen sowie das denaturierende Gel (Harnstoff) begründet waren. Daher wurden die Proben nach der PCR-Reaktion in wäßriger Lösung auf Polyacrylamidgele ohne Harnstoff aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und direkt eine Sequenzierungsreaktion eingebracht. Dadurch wurde zwar die Bandenzahl auf ca. die Hälfte reduziert, aber die DNA der interessierenden Banden konnte direkt als Scheibe aus dem Polyacrylamidgel in einer Sequenzierungsreaktion inkubiert und die Sequenz ermittelt werden. Die Verwendung nichtdenaturierender Gele hat sich damit als entscheidende Voraussetzung für die Identifizierung der interessanten Gensequenzen erwiesen.

Mit dieser Methode wurde die Gesamtanalyse der exprimierten RNAs in der Mausleber mit allen 26 5'-Primern durchgeführt. Dabei wurden insgesamt ca. 38 000 Banden identifiziert, die sich statistisch auf die Primerpaaare verteilen (Tab. 1).

ERSATZBLATT

 $\cdot \cdot$

ź

Die Methode sollte zu einer generell einsetzbaren und automatisierten Analytik ausgebaut werden, die ein zweifelsfreies Identifizieren von Unterschieden in der Genexpression zwischen zwei oder auch mehr Zuständen erlaubt, und dies möglichst nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ. Unter 1d) wurde bereits festgestellt, daß das Nebeneinanderlaufen der zu vergleichenden Proben nicht in jedem Falle die eindeutige Identifizierung von Unterschieden ermöglicht. Daher wurde die Methodik auf den automatischen Sequenzanalysator 373A adaptiert, der bis zu vier farbmarkierte Proben in einer Bahn vergleichen kann. Dazu wurden alle 26 5'-Primer mit den vier Farbstoffen TAMRA, ROX, FAM und JOE (entsprechend Protokoll der Fa. Applied Biosystems) markiert. Die jeweils 12 cDNA-Fraktionen von normaler Leber und von drei verschiedenen Zeitpunkten der Regeneration wurden entsprechend Beispiel 1b+c amplifiziert, wobei für jede der 4 Ausgangs-RNAs eine andere Farbmarkierung gewählt wurde. Die Konzentration der markierten 5'-Primer war 0.5 μ M und die dNTP-Konzentration wurde auf 100 μ M erhöht. Die PCR wurde ansonsten wie unter 1b beschrieben durchgeführt. Die Trennung wurde im denaturierenden Gel im 373A durchgeführt, und die Farbmarkierung wurde aufgezeichnet.

Tabelle 1: Anzahl der Banden im nichtdenaturierenden Polyacryamidgel von cDNA-Fraktionen, die duch reverse Transkription von Mausleber-RNA mit den 12 Primern T_{II}VN erhalten wurden. Die 312 PCR-Inkubationen wurden mit den in der Tabelle angegebenen Primer-Paaren durchgeführt. (Die 5'-Primer 1-26 entsprechen den in den Ansprüchen angegebenen Primern 1-26.

T	CA	CG	CT	CC	GA	GG	GT	GC	AA	AG	AT	AC	Σ	
Prim	er 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	4	x
1	92	188	73	137	186	182	67	189	121	142	129	147	1653	138
2	148	66	131	82	156	150	176	126	103	179	154	125	1596	133
3	81	172	172	121	89	82	135	131	114	97	145	124	1463	122
4	105	126	99	71	118	107	96	130	67	170	124	174	1387	116
5	94	182	104	157	101	91	70	91	115	89	148	103	1345	112
6	125	137	111	95	161	112	98	121	65	64	124	152	1365	114
7	62	93	129	60	169	146	176	64	104	175	123	156	1457	121
8	120	133	93	94	110	158	188	102	151	108	173	60	1490	124
9	183	157	124	148	173	167	180	167	76	146	90		1698	142
10	112	118	183	174	101	73	75	104	165	110	136		1462	122
11	98	180	174	159	140	139	123	101	147	73	176	138		137
12	111	129	164	81	126	135	133	89	180	96	152		1537	128
13	82	139	149	135	124	146	71	73	136	153	86		1384	115
14	73	146	180	93	90	134	167	80	160	70	72	126	1391	116
15	174	179	72	105	138	153	83	88	130	130	104	87	1443	120
16	77	109	145	162	67	127	164	135	132	108	104	120	1450	121
17	65	105	135	136	129	170	151	85	130	106	159	178	1549	129
18	121	185	74	134	117	122	100	66	123	72	74	110	1298	108
19	165	73	80	179	114	169	91	134	65	122	75	121	1388	116
20	165	141	84	69	71	170	62	73	87	68	101	135	1226	102
21	80	137	156	120	94.	179	66	126	161	131	188	89	1527	127
22	68	127	121	182	115	85	137	166	107	127	108	181	1524	127
23	156	141	131	78	164	183	92	157	123	95	138	84	1542	129
24	165	62	89	163	107	99	144	93	145	123	138	63	1391	116
25	82	185	187	71	114	184	140	103	142	101	116	170	1595	133
26	81	87	96	153	70	106	177	83	81	119	160	77	1290	108
Σ	2885	3497	3152	3159	3144	3569	3167	2877	3130	2974	3297	3149		
×	111	135	121	122	121	137	122	111	120	114	127	121	x =	122

H

3

i,

Patentansprüche

- 1. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression, gekennzeichnet dadurch, daß es aus mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren besteht, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleotid-Primern gebildet werden, die mit einem geeigneten Marker gekoppelt sind, der durch ein Nachweisverfahren erkannt wird.
- 2. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Länge der Oligonukleotid-Primer 6-13 Nukleotide beträgt.
- 3. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer eine gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen.
- 4. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß die 3'-Oligonukleotid-Primer eine Reihe von T-Nukleotiden, bevorzugt 8-12, und zusätzlich am 3'Ende in 1-3 Positionen alle möglichen Kombinationen der 4 Nukleotide aufweisen.
- 5. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß alle 5'- oder alle 3'- Primer markiert sind.
- 6. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierung radioaktiver Phosphor, ein Fluoreszenzfarbstoff, Biotin oder ein Antigen verwendet wird.
- 7. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-6, gekennzeichnet dadurch, daß die 5'-Oligonukleotid-Primer folgende Sequenzen aufweisen:
- 1. 5' TACAACGAGG3'

2.

23

4

4

3. CTTTCTACCC

TGGATTGGTC

- 4. TTTTGGCTCC
- 5. GGAACCAATC
- 6. AAACTCCGTC
- 7. TCGATACAGG
- 8. TGGTAAAGGG
- 9. TCGGTCATAG
- 10. GGTACTAAGG
- 11. TACCTAAGCG
- 12. CTGCTTGATG
- 13. GTTTTCGCAG
- 14. GATCAAGTCC
- 15. GATCCAGTAC
- 16. GATCACGTAC
- 17. GATCTGACAC
- 18. GATCTCAGAC
- 19. GATCATAGCC
- 20. GATCAATCGC
- 21. GATCTAACCG
- 22. GATCGCATTG
- 23. GATCTGACTG
- 24. GATCATGGTC
- 25. GATCATAGCG
- 26. GATCTAAGGC
- 8. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 7, gekennzeichnet dadurch, daß die 5'-Oligonukleotid-Primer nach Anspruch 7 als 3'-Oligonukleotid-Primer eingesetzt werden.
- 9. Verfahren zur Anwendung des Mittels nach Anspruch 1-8, gekennzeichnet dadurch, daß die gesamte RNA einer Zelle in cDNA umgeschrieben, diese anschließend mit dem Mittel in einer bestimmten Zahl, bevorzugt 288-360, paralleler und unabhängiger Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) amplifiziert, das entstehende Fragmentgemisch jeder Reaktion auf einer Bahn eines nichtdenaturierten Polyacrylamid-Gels aufgetrennt, das Bandenmuster registriert und mit einem Standard verglichen wird,

ERSATZBLATT

4

*1

ij

S. An

gegebenenfalls die DNA aus Banden isoliert und als Sonde zur Genisolierung verwendet wird.

- 10. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß jede PCR-Reaktion, bevorzugt eine Gesamtzahl von 312, auf der entsprechenden Zahl von Polyacrylamidgelen, bevorzugt 7 Gelen mit 48 Bahnen, getrennt, die Bandensignale durch Autoradiographie oder entsprechende nichtradioaktive Nachweise sichtbar gemacht, mit einem Scanner eingelesen und mit dem Muster von einer Referenzzelle verglichen werden.
- 11. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß sämtliche PCR-Reaktionen der Referenzzelle mit Primern durchgeführt werden, die mit einem bestimmten Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind und alle PCR-Reaktionen der zu untersuchenden Zelle mit Primern durchgeführt werden, die mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind.
- 12. Verfahren nach Anspruch 9 und 11, gekennzeichnet dadurch, daß jeweils die mit Primern gleicher Sequenz, aber verschiedenen Farbstoffen markierten Fragmente von Referenz- und zu untersuchender Zelle gemeinsam in einer Bahn eines Sequenzautomaten mit eingebautem Farbdetektionssystem aufgetrennt werden und die Unterschiede in der Genexpression durch unterschiedliches Farbsignal in einer bestimmten Position angezeigt werden.
- 13. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten, ihre DNA durch PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotin markiert, anschließend mit einer denaturierten cDNA-Bibliothek hybridisiert und an Streptavidin-Magnetkugeln gebunden wird, und die spezifisch gebundene cDNA nach Waschung der Kugeln, Eluierung, Bakterientransformation und Plasmidpräparation sequenziert und als bekanntes oder unbekanntes Gen identifiziert wird.
- 14. Verfahren nach Anspruch 9, 11 und 12, gekennzeichnet dadurch, daß die Anlagerung ("annealing") der Primer in der PCR-Reaktion bei 40° C erfolgt.

WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 94/26928

C12Q 1/68, C12P 19/34

A3 (43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

24. November 1994 (24.11.94)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE94/00568

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. Mai 1994 (17.05.94)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

(30) Prioritätsdaten:

P 43 17 414.0

18. Mai 1993 (18.05.93)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BAUER, David [DE/DE]; Uhlandstrasse 56, D-13156 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-2. März 1995 (02.03.95) berichts:

- (54) Title: COMPLEX DIAGNOSTIC AGENT OF GENETIC EXPRESSION AND MEDICAL DIAGNOSIS AND GENE ISOLATION PROCESS USING SAID DIAGNOSTIC AGENT
- (54) Bezeichburg: MITTEL ZUR KOMPLEXEN DIAGNOSTIK DER GENEXPRESSION UND VERFAHREN ZUR ANWENDUNG FÜR DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK UND DIE GENISOLIERUNG

(57) Abstract

A complex diagnostic agent of genetic expression consists of a set of at least 288 oligonucleotide primer pairs composed of a reserve of at least 24 5'-oligonucleotide primers and at least 12 3'-oligonucleotide primers. The length of the oligonucleotide primers lies between 6 and 13 nucleotides, and preferably equals 10 nucleotides. The sequences of the 5'-oligonucleotide primers preferably have the same number of G+C and A+T. With this agent, at least 288 parallel and independent PCR tests are carried out in a cDNA mixture. After separation in non-denaturating polyacrylamide gels, the line pattern is recorded and compared with the standard of a reference cell. The fragment profiles are preferably automatically recorded by colour marked primers. The invention has applications in molecular biology, in particular for identifying known and unknown expressed genes and for isolating genes, as well as in clinical diagnosis, for example for detecting morbid changes, including cancer.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression. Es besteht aus einem Satz von mindestens 288 Oligonukleorid-Primer-Paaren, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleond-Primern gebildet werden. Die Länge der Oligonukleond-Primer liegt bei 6-13, bevorzugt 10, Nukleonden, wobei die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen. Mit dem Mittel werden in einem cDNA-Gemisch mindestens 288 parallele und unabhängige PCR-Ansätze durchgeführt. Nach Trennung in nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen wird das Bandenmuster registriert und mit dem Standard einer Referenzzelle verglichen. Dabei wird bevorzugt mit farbmarkierten Primern eine automatische Aufzeichnung der Fragmentprofile vorgenommen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, insbesondere die Identifizierung bekannter und unbekannter exprimierter Gene und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik, z.B. zur Feststellung von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.

BNSDOCID: <WO___9426928A3_I_>

ij

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
ÂÜ	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinca	NL	Niederlande
	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BF		HŪ	Ungarn	NZ	Neusceland
BC	Bulgarien	IE	Irland	PL	Polen
E.J	Benin			PT	Portugal
BR	Brasilien	IΤ	Italien	RO	Ruminien
BY	Belarus	JР	Japan	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	KE	Kenya		
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CC	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Kores	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CN		LU	Luxemburg	TG	Togo
cs	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
CZ	Tschechische Republik			Π	Trinidad und Tobago
DΕ	Deutschland	MC	Monaco	ÜÀ	Ukraine
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanion	MG	Madagaskar		Usbekistan
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	
FR	Frankreich	MN	Mongolui	VN	Victnam

ij.

In: stional Application No PUT/DE 94/00568

A. CLASSI IPC 5	IFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68 C12P19/34	•	
	·		
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national cl	assification and IPC	
	SEARCHED		·
Minimum d IPC 5	ocumentation searched (classification system followed by classi C12Q C12P	ication symbols)	
Documentat	tion searched other than minimum documentation to the extent t	hat such documents are included in the fields i	rearched
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data	base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category '	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	ne relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol.257, 14 August 1992, AAAS, DC, US; pages 967 - 971 P. LIANG AND A.B. PARDEE 'Diffedisplay of eucaryoric messenger means of the polymerase chain recited in the application see page 967, middle column, line 39 see page 969, left column, line 63	erential RNA by reaction' ine 1 - page	1-5
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.
* Special cat	tegories of cited documents :	"T" leter document published after the int	renetional Gline Asta
"E" earlier of filing of "L" docume which citation "O" docume other r. "P" docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in order special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filing date but	To later document published after the int or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or to invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the de" "Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or ments, such combined with one or in ments, such combination being obvict in the art. "&" document member of the same paten	ith the application but heavy underlying the claimed invention to considered to occurrent is taken alone claimed invention aventive step when the lore other such docurrent to a person skilled
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international a	
	8 January 1995	06.02.95	
Name and r	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Authorized officer Hornia H	

Form PCT/ISA/218 (recond sheet) (July 1992)

1

(4)

In Monal Application No
PCT/DE 94/00568

C.(Continu	Ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
ategory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CANCER REASERCH, vol.52, no.24, 15 December 1992, WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; pages 6966 - 6968 P. LIANG ET AL. 'Differential display and cloning of messenger RNA from human breast cancer versus mammary epithelial cells' cited in the application see page 6966, right column, line 1 - line 43	1-5
Y	EP,A,O 531 027 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 10 March 1993 see page 3, line 20 - page 5, line 54; claims 1-8	1-5
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol.198, no.1, October 1991, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US; pages 86 - 91 A. LANDGRAF ET AL. 'Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunoabsorbent assay techniques' see page 87, right column, paragraph 2 - page 90, right column, paragraph 3	1-5
A	US,A,5 104 792 (SILVER ET AL.) 14 April 1992 insgesamt	1-14
Ρ,Υ	WO,A,93 18176 (DANA-FABER CANCER INSTITUTE) 16 September 1993 see page 11, line 5 - line 19	1-5
Ρ,Χ	NUCL. ACIDS RES., vol.21, no.18, 11 September 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 4272 - 4280 D. BAUER ET AL. 'Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR)' cited in the application insgesamt	1-14
P,X	DE,A,43 17 414 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR ÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 21 April 1994 insgesamt	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

1

3

3

In stional Application No
PUT/DE 94/00568

Category '	tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BIOTEC, vol.6, no.2, April 1994, BIOTEC, WüRZBURG, BRD; pages 32 - 35 D. BAUER ET AL. 'Differential display reverse transcription PCR' insgesamt	1-14
	_	-

Form PCT/ISA/218 (continuation of second sheet) (July 1992)

1

(4)

The state of the s

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 94/00568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent f memb	Publication date	
EP-A-0531027	10-03-93	NONE		
US-A-5104792	14-04-92	NONE		
WO-A-9318176	16-09-93	US-A- CA-A- EP-A-	5262311 2102784 0592626	16-11-93 12-09-93 20-04-94
DE-A-4317414	21-04-94	WO-A-	9426928	24-11-94

Form PCT/ISA/218 (putent family annex) (July 1992)

÷

N. C.

Ir stionales Aktenzeichen PCT/DE 94/00568

A. KLASS	IFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	······································	
IPK 5	C12Q1/68 C12P19/34		
Nach der In	sternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen k	Clernification and der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE	Property and and 11 th	····
	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssym	bole)	
IPK 5	C12Q C12P		
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, i	poweit diese unter die recherchierten Gebiet	ic fallen
	•		
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete	: Suchbegriffe)
C 470 37	PERSON AND PROPERTY IN THE ACCOUNT		
	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Anga	he der in Betrecht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Kategorie*	Bezeichnung der Verottenutchung, soweit erforderlich unter Anga	be det ill bedacit komiteiasci Tait	-
.,	COTTUGE		1_6
Y	SCIENCE, Bd.257, 14. August 1992, AAAS, W	ACUTNOTON	1-5
	Bd.257, 14. August 1992, AAAS, W	ASHINGTON,	
	Seiten 967 - 971		
	P. LIANG AND A.B. PARDEE 'Differ	ential	
	display of eucaryoric messenger		
	means of the polymerase chain re	action'	
	in der Anmeldung erwähnt	7-11- 1	
	siehe Seite 967, mittlere Spalte - Seite 970, rechte Spalte, Zeile		
	siehe Seite 969, linke Spalte, Zeite		
	Zeile 63		
	•	-/	
[No. 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17	Side Ashar Bases	
	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentiamilie	
	Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	T Spätere Veröffentlichung, die nach der oder dem Prioritätsdatum veröffentlich	
	entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, icht als besonders bedeutsam anzusehen ist	Anmeldung nicht kollidiert, sondern n	ur zumVerständnis des der
'E' Alteres	Dolument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Idedatum veröffentlicht worden ist	Erfindung zugrundeliegenden Prinzipe Theorie angegeben ist	•
.r. Actolle	entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhaft er-	"X" Veröffentlichung von besonderer Bede kann allein aufgrund dieser Veröffent	ichung nicht als neu oder auf
andere andere	en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer nim Rocherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die SIR einem anderen besonderen Grand angegeben ist (mie	erfinderischer Tätigkeit beruhend betr "Y" Veröffentlichung von besonderer Bede	achtet werden nature: die beansvruchte Frijodum
soil oc surgei	and the second approximation of the sufficient to (410	kann nicht als auf erfinderischer Tätig werden, wenn die Veröffentlichung m	picet beruhend betrachtet
O. Actou	entlichung, die sich auf eine mündliche Offenharung, lenutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	Veröffentlichungen dieser Kategorie is	n Verbindung gebracht wird und
'P' Veroff	entlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	diese Verbindung für einen Fachmant "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselb	
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
		05 02 05	
1	8. Januar 1995	06.02.95	
Name and	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
Name and	Europäisches Patentams, P.B. 5818 Patentiaan 2	bevolitiacing Bet Detictiaces	
	NL - 2280 HV Rijewijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,		
	Fax: (+31-70) 340-3016	Hornig, H	

Formhists PCT/ISA/216 (Biatt 2) (Juli 1992)

1

Ž

78

4

X.

Ir strongles Aktenzeichen
PUT/DE 94/00568

tegone"	ing) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erfordertich unter Angabe der in Betracht kom	menden Teile Betr. Antpruch Nr.
	CANCER REASERCH, Bd.52, Nr.24, 15. Dezember 1992, WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; Seiten 6966 - 6968	1-5
	P. LIANG ET AL. 'Differential display and cloning of messenger RNA from human breast cancer versus mammary epithelial cells' in der Anmeldung erwähnt	
	siehe Seite 6966, rechte Spalte, Zeile 1 - Zeile 43	
	EP,A,O 531 027 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 10. März 1993	1-5
	siehe Seite 3, Zeile 20 - Seite 5, Zeile 54; Ansprüche 1-8	
	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd.198, Nr.1, Oktober 1991, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US; Seiten 86 - 91	1-5
	A. LANDGRAF ET AL. 'Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunoabsorbent assay	
	techniques' siehe Seite 87, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 90, rechte Spalte, Absatz 3	
	US,A,5 104 792 (SILVER ET AL.) 14. April 1992 insgesamt	1-14
,Υ	WO,A,93 18176 (DANA-FABER CANCER INSTITUTE) 16. September 1993 siehe Seite 11, Zeile 5 - Zeile 19	1-5
, Х	NUCL. ACIDS RES., Bd.21, Nr.18, 11. September 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 4272 - 4280 D. BAUER ET AL. 'Identification of	1-14
	differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) in der Anmeldung erwähnt insgesamt	
, x	DE,A,43 17 414 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR ÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 21. April 1994 insgesamt	1-14
	-/	
		1

Formblatt PCT/ISA/216 (Fortsettung von Blatt 2) (Juli 1992)

1

A

In stionales Aktenzeichen
PCT/DE 94/00568

Categorie'	one' Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.					
, X	BIOTEC, Bd.6, Nr.2, April 1994, BIOTEC, WüRZBURG, BRD; Seiten 32 - 35 D. BAUER ET AL. 'Differential display reverse transcription PCR' insgesamt	1-14				
		-				

1

Ŷ

Angaben zu Veröffendichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In trionales Aktenzeichen
PCT/DE 94/00568

Im Recherchenbericht ungeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) Patentfam	Datum der Veröffentlichung	
EP-A-0531027	10-03-93	KEINE		
US-A-5104792	14-04-92	KEINE		
WO-A-9318176	16-09-93	CA-A-	5262311 2102784 0592626	16-11-93 12-09-93 20-04-94
DE-A-4317414	21-04-94	WO-A-	9426928	24-11-94

Formbistt PCT/ISA/218 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

-